

<https://helda.helsinki.fi>

Die proteolytische Aktivierung des Vaskulären Endothelzellwachstumsfaktors-C

Lackner, Marcel

2019-12-18

Lackner , M , Schmotz , C & Jeltsch , M 2019 , ' Die proteolytische Aktivierung des Vaskulären Endothelzellwachstumsfaktors-C ' , Lymphologie in Forschung und Praxis , vol. 23 , no. 2 , pp. 88 . <

https://www.dglymph.de/fileadmin/user_upload/Lymph_02-19_online.pdf >

<http://hdl.handle.net/10138/313643>

unspecified

acceptedVersion

Downloaded from Helda, University of Helsinki institutional repository.

This is an electronic reprint of the original article.

This reprint may differ from the original in pagination and typographic detail.

Please cite the original version.

Die proteolytische Aktivierung des Vaskulären Endothelzellwachstumsfaktors-C

Marcel Lackner¹, Constanze Schmotz², Michael Jeltsch^{3,4,*}

¹University of Hamburg, Germany; ²Department of Virology, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland; ³Individualized Drug Therapy Research Program, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland; ⁴Wihuri Research Institute, Helsinki, Finland

*Korrespondenzautor: Michael Jeltsch, Individualized Drug Therapy Research Program, Faculty of Medicine, University of Helsinki, P.O.B. 63 (Haartmaninkatu 8), 00290 Helsinki, Finland; Phone: +358-2941-25514; Fax: +358-2941-25510; E-mail: michael@jeltsch.org

Zusammenfassung

Enzymatische Schnitte der Polypeptidkette von Proteinen sind Bestandteil vieler biologischer Prozesse, so z.B. bei der Zerlegung von Proteinen während der Verdauung. Gezielte enzymatische Schnitte werden auch benutzt, um die Aktivität bestimmter Proteine ein- oder auszuschalten. So z.B. wird der lymphangiogene Vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor-C (VEGF-C) als Vorläufermolekül synthetisiert, welches durch die enzymatische Entfernung von Teilen des Proteins in eine aktive Form umgewandelt werden muss, bevor es seine Rezeptoren binden und aktivieren kann. Dabei werden C- und N-terminale Propeptide von VEGF-C entfernt. Die konstitutive C-terminale Spaltung wird durch Propeptidkonvertasen wie Furin vermittelt. Die darauffolgende, aktivierende Spaltung kann durch mindestens vier verschiedene Proteasen vermittelt werden: Plasmin, ADAMTS3, prostata-spezifisches Antigen (PSA) und Cathepsin D. Resultierend aus der Prozessierung durch unterschiedliche Proteasen entstehen unterschiedliche, "reife" VEGF-C-Formen, die sich in ihrer Affinität und ihrem Rezeptor-Aktivierungspotential unterscheiden. Das CCBE1-Protein reguliert die Prozessierung von VEGF-C durch ADAMTS3 und PSA, aber nicht die durch Plasmin. Während des physiologischen Wachstums des Lymphgefäßsystems in der Embryonalentwicklung wird VEGF-C hauptsächlich durch die ADAMTS3-Protease aktiviert. Im Unterschied dazu wird vermutet, dass Plasmin für die Wundheilung und PSA für die mit Tumorstadium assoziierte, pathologische Lymphangiogenese verantwortlich ist. Cathepsin D wurde ebenfalls mit der Tumor-Lymphangiogenese in Verbindung gebracht; darüberhinaus könnte das im Speichel enthaltene Cathepsin D, durch Wundlecken, latentes VEGF-C aktivieren und dadurch die Wundheilung beschleunigen. Die molekularen Details der proteolytischen Aktivierung von VEGF-C werden erst seit kurzer Zeit intensiv erforscht und wahrscheinlich sind noch nicht alle aktivierenden Proteasen bekannt. Jedoch scheint es, dass die Aktivität von VEGF-C für verschiedene spezifische Funktionen von unterschiedlichen Proteinasen reguliert wird. Obwohl VEGF-C in experimentellen Tierversuchen eine zentrale Stellung in der Tumorstadiumprogression und -metastasierung einnimmt, ist die Aussagekraft der bisherigen korrelativen Studien zur Rolle von VEGF-C bei Tumorerkrankungen des Menschen begrenzt. Dieser Umstand ist nicht zuletzt in den fehlenden Möglichkeiten begründet, zwischen der inaktiven und den aktiven Formen zu unterscheiden.

Schlüsselwörter: VEGF-C, Lymphangiogenese, Proteinasen, Proteolyse

The Proteolytic Activation of Vascular Endothelial Growth Factor-C

Summary

The enzymatic cleavage of the backbone of proteins (proteolysis) is integral to many biological processes, e.g. for the breakdown of proteins in the digestive system. Specific proteolytic cleavages are also used to turn on or off the activity of proteins. For example, the lymphangiogenic vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is synthesized as a precursor molecule that must be converted to a mature form by the enzymatic removal of C- and N-terminal propeptides before it can bind and activate its receptors. The constitutive C-terminal cleavage is mediated by proprotein convertases such as furin. The subsequent activating cleavage can be mediated by at least 4 different proteases: by plasmin, ADAMTS3, prostate-specific antigen (PSA) and cathepsin D. Processing by different proteases results in distinct forms of "mature" VEGF-C, that differ in their affinity and their receptor activation potential. The CCBE1 protein regulates the activating cleavage of VEGF-C by ADAMTS3 and PSA, but not by plasmin. During embryonic development of the lymphatic system, VEGF-C is activated primarily by the ADAMTS3 protease. In contrast, it is believed that plasmin is responsible for wound healing lymphangiogenesis and PSA for tumor-associated pathological lymphangiogenesis. Cathepsin D has also been implicated in tumor lymphangiogenesis. In addition, cathepsin D contained in saliva might activate latent VEGF-C upon wound licking, thereby accelerating wound healing. The molecular details of proteolytic activation of VEGF-C are only recently extensively explored, and we likely do not know yet all activating proteases. It appears that the activity of VEGF-C is regulated for different specific functions by different proteinases. Although VEGF-C clearly plays a pivotal role for tumor progression and metastasis in experimental animal studies, the relevance of most correlative studies on the role of VEGF-C in human cancers is quite limited until now, also due to the lack of methods to differentiate between inactive and active forms.

Key Words: VEGF-C, lymphangiogenesis, proteinases, proteolysis

Liste der benutzten Abkürzungen

ADAM	Eine Disintegrin- und Metalloproteinase (A Disintegrin And Metalloproteinase)
ADAMTS3	Eine Disintegrin- und Metalloproteinase mit Thrombospondinmotiven-3 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-3)
CatD	Cathepsin D
CCBE1	Kollagen- und Calcium-bindendes EGF-Domäne-enthaltendes Protein 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
HS	Hennekam Syndrom
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
KLK3	Kallikrein-verwandte Peptidase 3 (synonym mit PSA)
MMP-3	Matrix-Metalloproteinase-3
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (Transforming Growth Factor- β)
VEGF-A	Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A), wird oft auch nur als "VEGF" bezeichnet
VEGF-C, -D	Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-C, -D
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VHD	VEGF-Homologie-Domäne

Proteinasen (proteinspaltende Enzyme)

Proteinasen (auch Proteasen) sind Enzyme, die Proteine spalten indem sie die Peptidbindungen der Aminosäurenkette hydrolysieren (Abbildung 1). Sie kommen im menschlichen Körper sowohl innerhalb (intrazellulär) als auch außerhalb (extrazellulär) von Zellen vor und sind von essentieller Bedeutung für eine Vielzahl von Zell- und Körperfunktionen. So zum Beispiel für die Prozessierung von Antigenen im Zuge einer Immunreaktion, für den Abbau von beschädigten oder überflüssig gewordenen Proteinen (z.B. in Lysosomen) sowie für die Aufspaltung von Nahrungsproteinen im Magen-Darm-Trakt. Hier zersetzen z.B. Pepsin im Magen (Vorstufe Pepsinogen, aktiviert durch Autoproteolyse bei niedrigen pH-Werten) und Trypsin im Darm (Vorstufe Trypsinogen, aktiviert durch Autokatalyse) die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine.

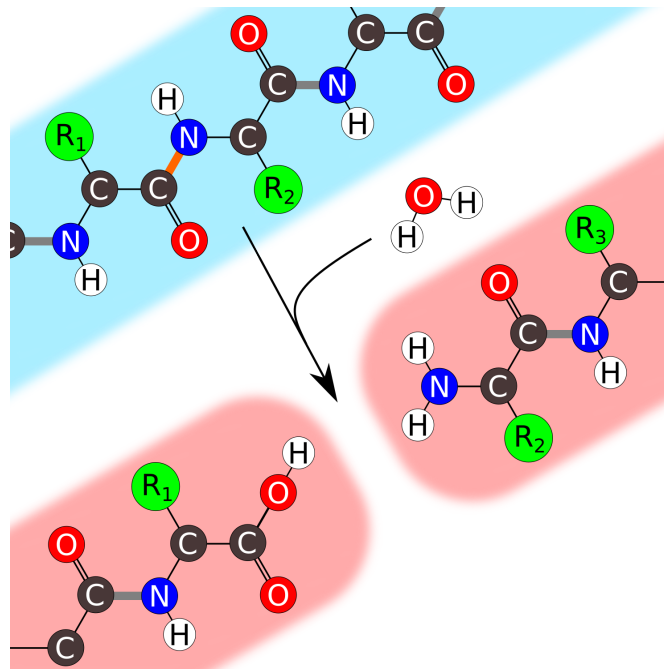


Abbildung 1. Proteolyse. Die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung (orange) eines Proteins (blau hinterlegt) in zwei Teile (rot hinterlegt). Peptidbindungen des Protein-Rückgrats sind mit dicken Bindestrichen dargestellt. Die Aminosäure-Seitenketten sind als grüne Kreise symbolisiert. Ohne Katalyse durch Enzyme (Proteinasen) ist diese chemische Reaktion extrem langsam.

Aktivierung von Proteinen

Eine weitere wichtige Funktion erfüllen Proteinasen bei der Aktivierung von Proteinen. Viele Proteine werden als inaktive Vorstufen produziert und erst bei Bedarf durch proteolytische Spaltung aktiviert. Auch die Proteinasen selbst werden als inaktive Pro-Proteinasen produziert und müssen durch die proteolytische Abspaltung von Propeptiden aktiviert werden. Dies ist von essentieller Bedeutung, da die unkontrollierte Aktivität von Proteinasen sonst Zellen und die extrazelluläre Matrix (EZM) zersetzen

würden.

Zu den vermutlich bekanntesten proteolytisch kontrollierten Prozessen zählen die Blutgerinnung, die Begrenzung der Blutgerinnung und deren Umkehrung, d.h. die Auflösung von Blutgerinnseln [1,2]. Viele der im Blut befindlichen Gerinnungsfaktoren sind Proteinasen, die wiederum andere Proteinasen aktivieren, usw. ("proteolytische Kaskade") um schlussendlich im letzten Schritt die proteolytische Umwandlung von löslichem Fibrinogen in polymerisierendes Fibrin zu katalysieren.

Aktivierung von Wachstumsfaktoren

Viele Wachstumsfaktoren und auch einige Zytokine werden als inaktive Vorstufen produziert, welche erst durch proteolytische Spaltung ("Prozessierung") aktiv werden. Zu den bekannteren Wachstumsfaktoren, die durch proteolytische Spaltung aktiv werden, gehören z.B. der Transformierende Wachstumsfaktor- β (engl. Transforming Growth Factor- β , TGF- β)[3], aber auch die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D. Viele Studien haben sich mit den Mechanismen und der Regulation der VEGF-Rezeptor-Aktivierung durch die VEGFs beschäftigt [4], wohingegen relativ wenig über die vorgelagerten Prozesse der Mobilisierung und Aktivierung der VEGFs bekannt ist.

Die VEGF-Familie

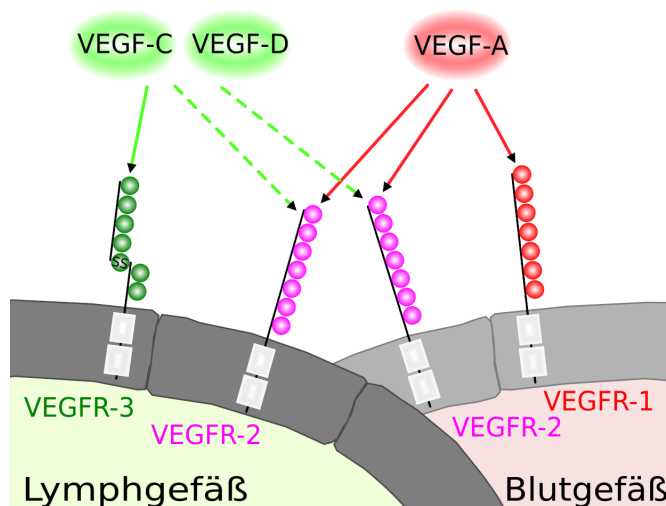


Abbildung 2. Die Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D und deren Rezeptoren. Das Wachstum und die Funktion von Blut- und Lymphgefäßen wird durch die Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFs) gesteuert. VEGF-A ist der wichtigste Wachstumsfaktor für Blutgefäße, und VEGF-C der wichtigste Wachstumsfaktor für Lymphgefäße. VEGF-A wird von VEGF-Rezeptor-1 und VEGF-Rezeptor-2 erkannt. VEGF-C und VEGF-D werden vom VEGF-Rezeptor-3 (und unter bestimmten Umständen auch von VEGF-Rezeptor-2) erkannt. VEGFR-1 kommt nur auf den Endothelzellen der Blutgefäße vor und VEGFR-3 nur auf den Endothelzellen der Lymphgefäße. Demgegenüber wird VEGFR-2 auf beiden Gefäßtypen angetroffen. Wird z.B. VEGF-C oder VEGF-D vom VEGF-Rezeptor-3 auf der Zellmembran einer lymphatischen Endothelzelle erkannt, signalisiert dies der Zelle, dass sie sich teilen und fortbewegen soll, wodurch das Gefäßwachstum eingeleitet wird.

Die Biologie der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D wurde in einer früheren Übersichtsarbeit eingehend beschrieben [5]. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle lediglich eine kurze Einführung erfolgen, in welcher die für diesen Artikel relevanten Eigenschaften und Merkmale von VEGF-C und VEGF-D erläutert werden. VEGF-C und VEGF-D gehören zur VEGF-Familie (siehe auch Abbildung 2 für einen kurzen Überblick über VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und deren Rezeptoren).

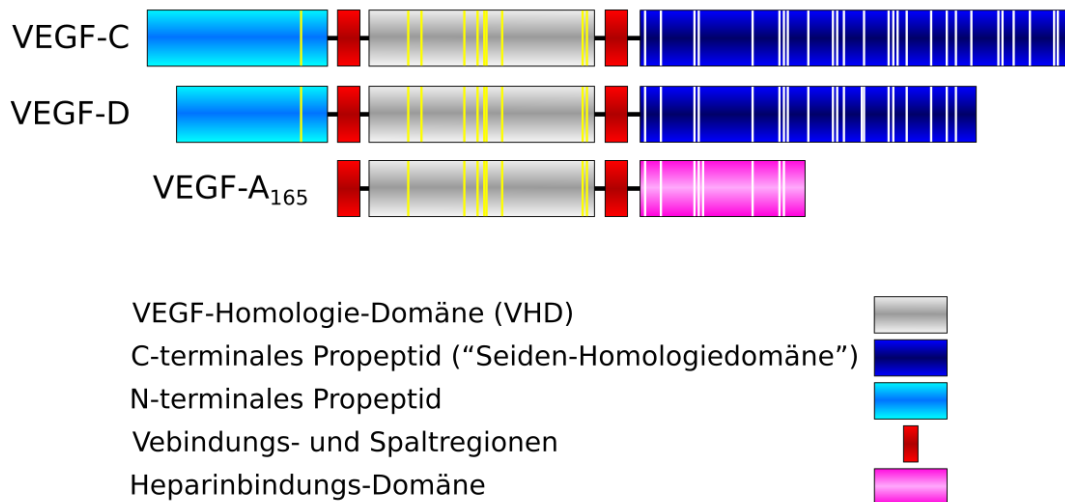


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Domänen-Organisation der VEGF-Wachstumsfaktoren am Beispiel von VEGF-C/D und VEGF-A. Die VEGF-Wachstumsfaktoren bestehen aus der zentralen VEGF-Homologie-Domäne (in grau) und fakultativen akzessorischen Domänen (in blau, bzw. magenta). Die proteolytischen Schnitte finden in der Regel zwischen den Domänen (in rot) statt. Die charakteristischen Cystein-Muster der VEGF-Familie und des C-terminalen Propeptids sind durch gelbe, bzw. weiße Linien dargestellt.

Charakteristisch für die Mitglieder dieser Familie ist als zentrales Strukturelement die VEGF Homologie-Domäne (VHD). Sie ist knapp 100 Aminosäuren lang und hat eine charakteristische Anordnung von acht Cystein (C) -Aminosäureresten (CX₂₂CPXCVX₃RCXGCCX₆CX₃₃₋₃₅CXC), welche untereinander Disulfidbrücken ausbilden und dadurch den VEGFs einen sehr stabilen Kern verleihen. Dieser Kern bildet auch jene Struktur, die den Rezeptor erkennt und damit ausschlaggebend ist, an welche der drei VEGF-Rezeptoren (-1, -2 und -3) der jeweilige VEGF bindet. Zusätzlich zu diesem Kern besitzen die meisten VEGFs weitere Domänen, die entweder der VHD vor- (N-terminal) oder nach- (C-terminal) geschaltet sind (Abbildung 3). Diese zusätzlichen Domänen verleihen den VEGFs die Fähigkeit mit weiteren Bindungspartnern zu interagieren. So besitzen beispielsweise verschiedene Isoformen von VEGF-A unterschiedlich starke C-terminale Heparin-Bindungsdomänen, mit denen sie Heparansulfat binden und dadurch mehr oder weniger an Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix (EZM) immobilisiert werden, was wiederum unterschiedliche Aktivitätsprofile der Isoformen bedingt. Proteasen wie Plasmin können die längeren EZM-gebundenen VEGF-A-Isoformen in kürzere, besser

diffusible Isoformen umwandeln [6,7]. Die Spaltung durch verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), insbesondere MMP-3, wandelt z.B. die Hauptisoform VEGF₁₆₅ in kürzere, nicht Heparansulfat bindenden Isoformen um [8].

Die C-terminale Domäne von VEGF-C

Auch VEGF-C und VEGF-D werden über ihre C-terminale Domäne auf Zelloberflächen und der EZM immobilisiert [9]. Im Gegensatz zu allen anderen VEGF-Familienmitgliedern hat diese C-terminale Domäne jedoch noch eine andere Funktion: sie blockiert die Aktivität von VEGF-C und VEGF-D [10]. Es wird vermutet, dass diese Domäne räumlich den Zugang zur Rezeptorbindungsstelle blockiert. Diese Annahme würde auch erklären, warum die C-terminale Domäne von VEGF-C fast doppelt so gross ist wie die VHD. Weiterhin rätselhaft und ungeklärt ist die Herkunft dieser Proteinsequenz. In den Genomen von Wirbeltieren scheint es keinerlei homologe Sequenzen zu geben und die ähnlichsten Proteine kommen als Bestandteil von Speichelsekreten einiger seidenspinnender Mückenlarven, z. B. *Chironomus tentans* [11], vor. Aus diesem Grund wird diese Domäne auch Seiden-Homologiedomäne genannt, wobei deren Aminosäuresequenz keinerlei Verwandtschaft mit den klassischen Seidenproteinen aufweist.

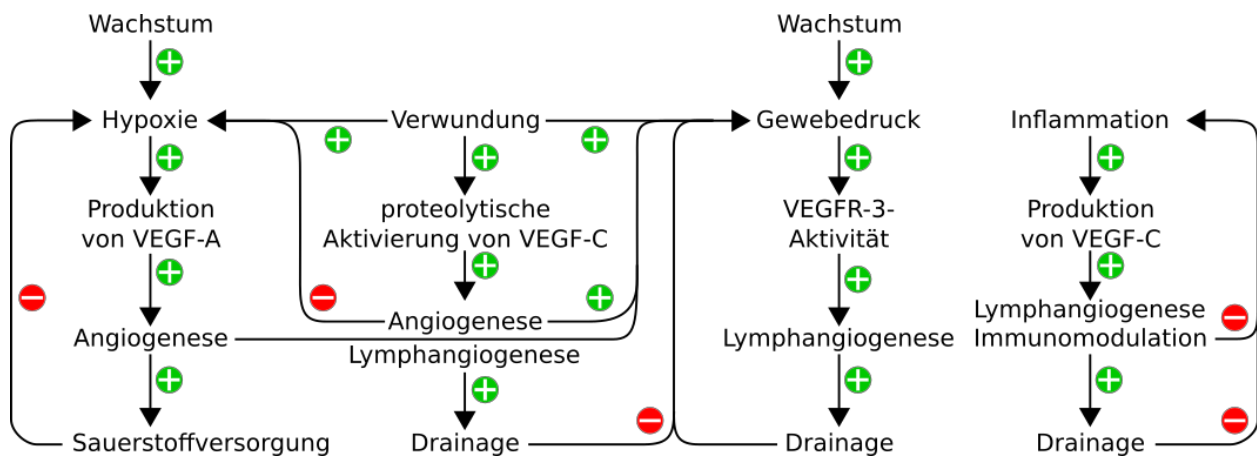


Abbildung 4. Schematische Darstellung bekannter Regelkreise in der Angiogenese und Lymphangiogenese. Die Produktion von VEGF-A und VEGF-C ist im Regelfall durch negative Rückkopplung selbst-limitierend. Sobald eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt oder der Gewebedruck normalisiert wurde, werden die Signale zum Blut, bzw. für das Lymphgefäßwachstum heruntergefahren.

Hypoxie reguliert Angiogenese, aber wie wird Lymphangiogenese reguliert?

Das für die Blutgefäßbildung verantwortliche VEGF-A wird auf der Ebene der Transkription reguliert. Ist die Sauerstoffversorgung im Gewebe nicht ausreichend (Hypoxie), wird die Produktion von VEGF-A eingeschaltet, was wiederum zu Blutgefäßwachstum und Normalisierung der Sauerstoffversorgung führt [12]. Demgegenüber verbessert die VEGF-C-Produktion die Sauerstoffversorgung des Gewebes nicht primär, dafür jedoch die Gewebsdrainage und den Immunzellverkehr (siehe Abbildung 4). Vermutlich wird deshalb die Produktion von VEGF-C, im Gegensatz zu VEGF-A, durch proinflammatorische Signale

und nicht oder nur unwesentlich durch Hypoxie gesteuert [13–15]. Zudem kann VEGF-C zur Begrenzung der Entzündungsreaktion über verstärkte Drainage [16,17] und Immunomodulation [18] beitragen. Eine weitere Rolle spielt VEGF-C in den für die Fettabsorption spezialisierten Lymphgefäßen der Dünndarmzotten (Lacteals), deren Existenz eine permanente Stimulation durch VEGF-C erfordert [19]. Dieses wird als Antwort auf die mikrobielle Darmflora von Makrophagen produziert [20].

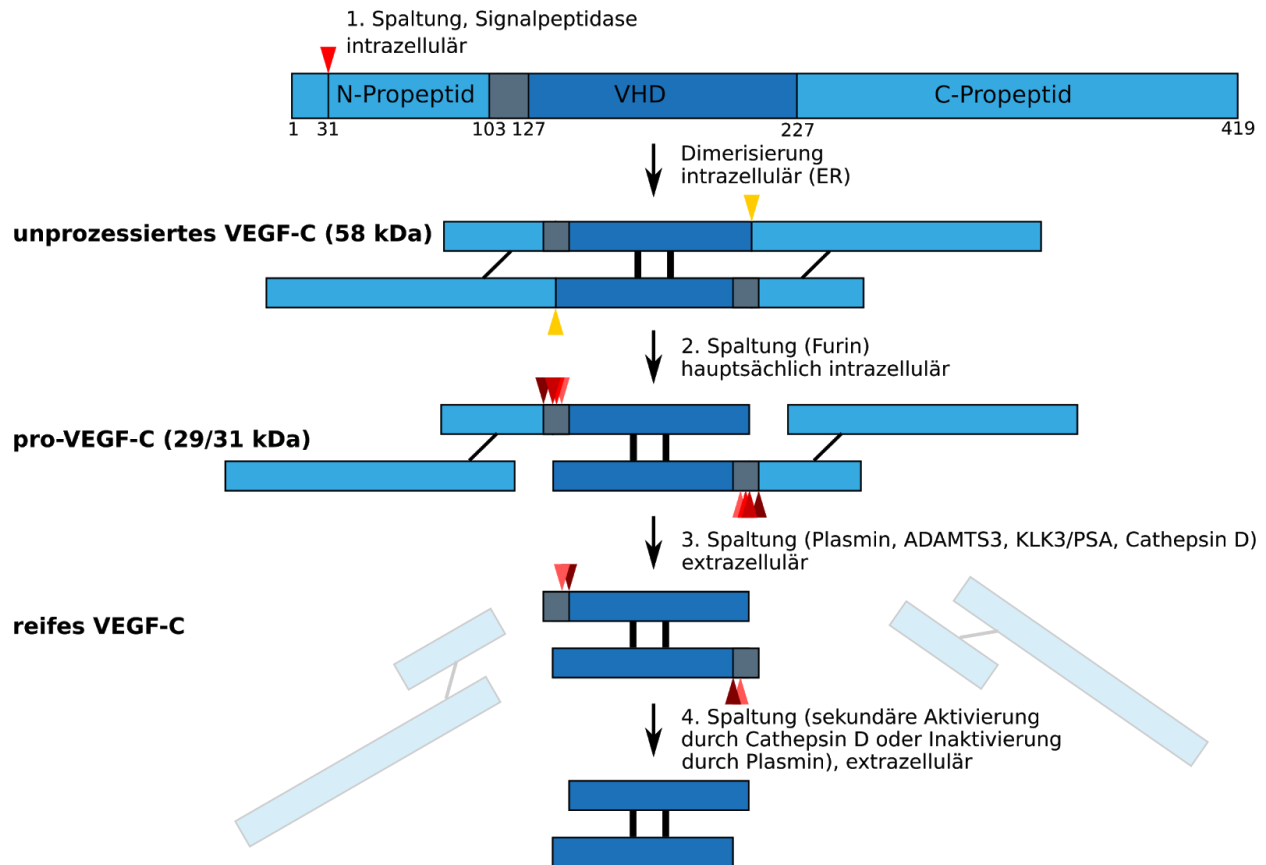


Abbildung 5. Schematische Darstellung der proteolytischen Aktivierung von VEGF-C. VEGF-C wird als Vorläufer mit einer Größe von 58 kDa synthetisiert. Diese vollständige Form (präpro-VEGF-C) ist mehr als doppelt so groß wie reifes VEGF-C und wird, nachdem das Signalpeptid beim Transport in das endoplasmatische Retikulum abgespalten wurde, im trans-Golgi-Netzwerk durch die Proproteinkonvertasen PC5, PC7 und insbesondere Furin in pro-VEGF-C umgewandelt. Dies geschieht durch die Spaltung der Polypeptidkette C-terminal von der VHD (durch ein gelbes Dreieck markiert). Ist Furin blockiert, wird unprozessiertes VEGF-C nicht in pro-VEGF-C umgewandelt [23]. Pro-VEGF-C kann den VEGFR-3 zwar binden, jedoch nicht aktivieren, und fungiert daher als kompetitiver Inhibitor für aktives VEGF-C, was sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt wurde [24]. Erst ein weiterer proteolytischer Schnitt (N-terminal der VHD, durch rote Dreiecke markiert) überführt pro-VEGF-C in eine aktive Form. Reifes VEGF-C hat bei weitem die höchste Affinität für die Bindung und Aktivierung von VEGFR -2 und -3 [10]. Unprozessiertes VEGF-C ist im Zellkulturüberstand kaum nachweisbar und kommt vermutlich physiologisch nur innerhalb der Zelle vor [10].

Ein erhöhter interstitieller Gewebedruck verstärkt über die durch β 1-Integrin und die Integrin-linked Kinase (ILK) vermittelte druckabhängige Signaltransduktion des VEGF-Rezeptor-3 ("Mechanotransduktion") das Wachstum von Lymphgefäßen und normalisiert damit den Gewebedruck [21,22]. Ob der Gewebedruck auch einen Einfluß auf die Produktion oder Aktivierung von VEGF-C hat, ist unbekannt.

Während der Embryonalentwicklung wird VEGF-C durch ADAMTS3 aktiviert

Über die Identifizierung von Mutationen im *CCBE1*-Gen als Ursache für die systemische Lymphgefäßdysplasie im Hennekam-Syndrom [25] konnte mit ADAMTS3 die erste Proteinase identifiziert werden, die VEGF-C während des embryonalen Wachstums aktiviert [26,27]. Die ADAMTS-Proteinasen sind Zelloberflächen- oder EZM-lokalisierte Multidomänenenzyme, die eng mit der ADAM-Proteinasefamilie verwandt sind, aber im Unterschied zu den membrangebundenen ADAM-Proteinasen sezerniert werden. Als weiteres Merkmal enthalten ADAMTS eine oder mehrere Wiederholungen des Thrombospondin-Typ 1 Motivs. Einige Funktionen dieser Proteinfamilie wie z.B. die Prokollagen-Prozessierung oder die Spaltung von Proteoglykanen, sind mit der Regulierung der Angiogenese in Verbindung gebracht worden [28]. ADAMTS3 gehört aufgrund seiner Struktur zusammen mit ADAMTS-2 und ADAMTS-14 in die Prokollagenase-Gruppe [29] und spaltet, zumindest in-vitro, auch Prokollagen-N-Propeptid [30].

Wird die Funktion von ADAMTS2 durch Mutationen beeinträchtigt, ist die proteolytische Kollagenreifung gestört und ein Bindegewebsdefekt die Folge (Ehlers-Danlos-Syndrom, Dermatosparaxis-Typ) [31]. Patienten ohne oder mit kompromittierten *ADAMTS3*-Genen zeigen im Gegensatz dazu keine Defizite in der Kollagensynthese, dafür aber ausgeprägte Defizite in der Entwicklung des Lymphgefäßsystems [32,33].

Obwohl die Biosynthese von VEGF-D der von VEGF-C (schematisch dargestellt in Abbildung 5) sehr ähnelt [34], kann ADAMTS3 VEGF-D nicht aktivieren [26,35]. Auch die anderen Prokollagenasen der ADAMTS-Familie (ADAMTS2 und ADAMTS14) können VEGF-C nicht aktivieren [26].

Aktivierung von VEGF-C in der Wundheilung durch Plasmin und Cathepsin D

Die Wiederherstellung von Sauerstoffversorgung und Immunfunktion durch Blut- und Lymphgefäße sind wichtige Bestandteile der Wundheilung. Eine Beschleunigung der Wundheilung durch VEGF-C wurde erstmals 2004 im Tierversuch beobachtet [36,37]. Bei der Aktivierung von Blutplättchen während des Wundverschlusses wird inaktives VEGF-C aus den α -Granula freigesetzt [38]. Plasmin, das später an der Auflösung der temporären Fibrin-Matrix beteiligt ist [39], kann wahrscheinlich dieses und auch auch latent in der extrazellulären Matrix eingelagertes VEGF-C [40] aktivieren [41]. Auch im Speichel vorhandenes Cathepsin D aktiviert effektiv VEGF-C [42]. Die Beschleunigung der Wundheilung durch Speichel [43] lässt sich zum Teil vielleicht auch auf die Aktivierung von VEGF-C durch Cathepsin D zurückführen. Allerdings werden bei der Wundheilung noch viele andere Enzyme freigesetzt, die eine relativ breite Substratspezifität besitzen wie z.B. MMP-3, und die evtl. neben der Aktivierung durch Mobilisierung von EZM-gebundenem VEGF-A auch zur Aktivierung von VEGF-C beitragen können.

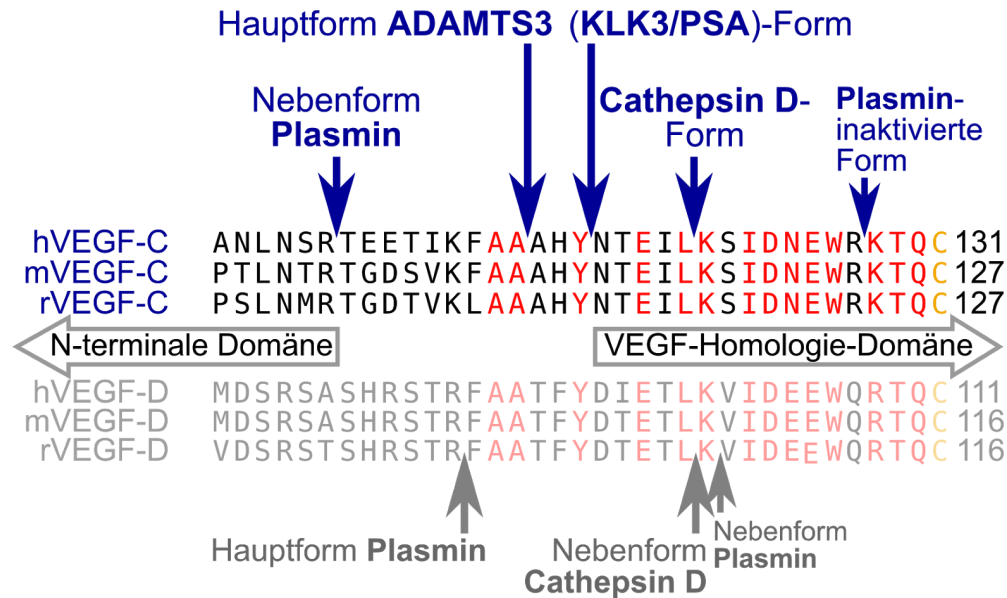


Abbildung 6. Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierungsstellen in den Aminosäuresequenzen von VEGF-C und VEGF-D. Die Aktivierung von VEGF-C und VEGF-D erfolgt durch die proteolytische Spaltung des Proteins zwischen der N-terminalen Domäne und der VEGF-Homologie-Domäne. Je weiter C-terminal (nach rechts in der Darstellung) die Spaltung von VEGF-C erfolgt, desto geringer ist die biologische Aktivität der resultierenden VEGF-C-Form [42]. Die Spaltung von VEGF-C durch Plasmin innerhalb der VEGF-Homologie-Domäne führt zur kompletten Inaktivierung von VEGF-C [26]. Alternativ kann VEGF-C auch durch lösliche Isoformen seiner Rezeptoren sequestriert und damit inaktiviert werden [44]. Abbildung 6 modifiziert unter Creative Commons nach [42].

Aktivierung von VEGF-C durch das prostataspezifische Antigen (PSA, KLK3)

Etwas überraschend, aber nicht ohne Vorwarnung [45], stellte sich heraus, dass das in der Prostatakrebs-Früherkennung umstrittene PSA (Prostataspezifische Antigen) VEGF-C aktivieren kann [42]. Trotz seiner Prominenz als Bluttest ist weniger bekannt, dass es sich bei PSA um eine Proteinase handelt, deren biologische Hauptaufgabe es ist, die gelförmige Konsistenz des männlichen Ejakulats zu verflüssigen, was den Samenzellen erst die Fortbewegung ermöglicht [46].

Schon vor über 20 Jahren wurde VEGF-A in Samenflüssigkeit nachgewiesen [47,48], wo es die Beweglichkeit der Spermatozoen positiv beeinflusst [49]. Interessanterweise konnte aber erst kürzlich nachgewiesen werden, dass auch VEGF-C ein Bestandteil des männlichen Ejakulats ist, und dass die Aktivierung dieses VEGF-C zeitgleich mit der Verflüssigung des männlichen Ejakulats durch PSA stattfindet [42]. Ob und welche Auswirkungen dies auf die Reproduktion hat, ist noch nicht geklärt. VEGF-C wird sicherlich für die Implantation des Embryos in die Gebärmutterschleimhaut benötigt, obwohl VEGF-C hier eher auf die Blutgefäße einwirkt [33]. VEGF-C könnte aber auch für die Immunmodulation eine Rolle spielen [50] oder es könnte - wie schon für VEGF-A beschrieben [49] -

255 einen direkten chemotaktischen oder chemokinetischen Effekt auf die Spermatozoen ausüben.

Die Schlüsselstellung von CCBE1 als Cofaktor der Aktivierung

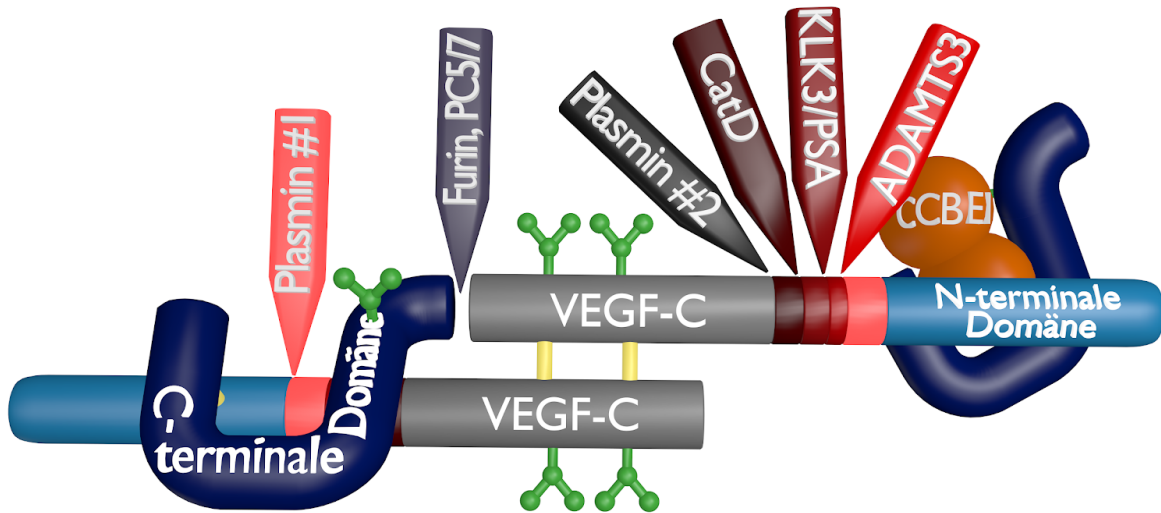


Abbildung 7. Schematische Darstellung des hypothetischen Wirkmechanismus von CCBE1. Die C-terminale Domäne (in dunkelblau) des pro-VEGF-C versperrt einigen Enzymen den Zugang zu den ihren proteolytischen Schnittstellen (links). Das CCBE1-Protein verursacht eine Konformationsänderung in VEGF-C und gibt damit die Schnittstellen frei (rechts). Für ADAMTS3 und KLK3/PSA ist der CCBE1-Effekt auf die VEGF-C-Aktivierung belegt und für Cathepsin D wird er vermutet. Nachdem VEGF-C z.B. an der primären Schnittstelle von Plasmin (#1) aktiviert wurde, kann Cathepsin D noch mit einen zusätzlichen Schnitt das Protein verkürzen (sogenannte sekundäre Aktivierung). Je kürzer das N-terminale Ende des aktiven VEGF-C, desto schwächer bindet und aktiviert es seine Rezeptoren. Mit der Spaltung an der sekundären Schnittstelle von Plasmin (#2) verliert VEGF-C jegliche Aktivität gegenüber VEGFR-2 und VEGFR-3.

Um schnell auf veränderten Bedarf reagieren zu können, ist es sinnvoll, die Verzögerung durch den vorgeschalteten Prozess der VEGF-C-Produktion zu vermeiden und inaktives ("latentes") VEGF-C auf Vorrat zu produzieren und bei Bedarf zu aktivieren. Eine ähnliche Form der Speicherung und Aktivierung ist z.B. von TGF- β bekannt [51]. Auch die heparinbindenden Isoformen von VEGF-A werden durch reversible Bindung an extrazelluläre Proteine inaktiviert und können bei Bedarf z. B. durch proteolytische Spaltung durch Plasmin reaktiviert werden [6]. Eine Zusammenfassung aller bisher publizierten, VEGF-C aktivierenden Enzyme und der exakten Position der Spaltstellen findet sich in Abbildung 6.

Das Kollagen- und Calcium-bindendes EGF-Domäne-enthaltendes Protein 1 (CCBE1) reguliert die

VEGF-C-aktivierende Funktion der ADAMTS3-Proteinase. CCBE1 besteht aus zwei Domänen: Die N-terminale Domäne wird hauptsächlich aus drei EGF-ähnlichen Repeats gebildet, und die C-terminale Domäne aus zwei Kollagenmotiven. Beide Domänen sind in der Lage die Aktivierung von VEGF-C durch ADAMTS3 zu beschleunigen. Die N-terminale Domäne von CCBE1 ist für die Kolo-kalisierung von VEGF-C und ADAMTS3 mit CCBE1 zum Aktivierungskomplex verantwortlich, und die C-terminale Domäne beschleunigt die katalytische Spaltung von VEGF-C durch ADAMTS3 [40]. Vermutlich erfolgt die Beschleunigung dadurch, dass CCBE1 eine sterische Blockade der Schnittstellen durch die C-terminale Domäne von VEGF-C aufhebt (Abbildung 7). Die hinsichtlich der Lokalisierung des Aktivierungskomplexes verschiedenen Aktivierungswege von VEGF-C werden in Abbildung 8 erläutert.

Das **Hennekam-Syndrom** (HS) ist eine seltene angeborene Erkrankung, deren Hauptmerkmal ein generalisiertes Lymphödem ist. Ursprünglich wurden Mutationen im *CCBE1*-Gen als Ursache identifiziert. Mittlerweile sind jedoch Mutationen in drei verschiedenen Genen bekannt, die HS auslösen können. Für zwei dieser Gene (*CCBE1* und *ADAMTS3*) ist deren Funktion innerhalb des VEGF-C-Signaltransduktionswegs bekannt. Es wird vermutet, dass das dritte Gen (*FAT4*) ebenfalls eine wichtige Funktion innerhalb des VEGF-C-Signaltransduktionswegs ausübt.

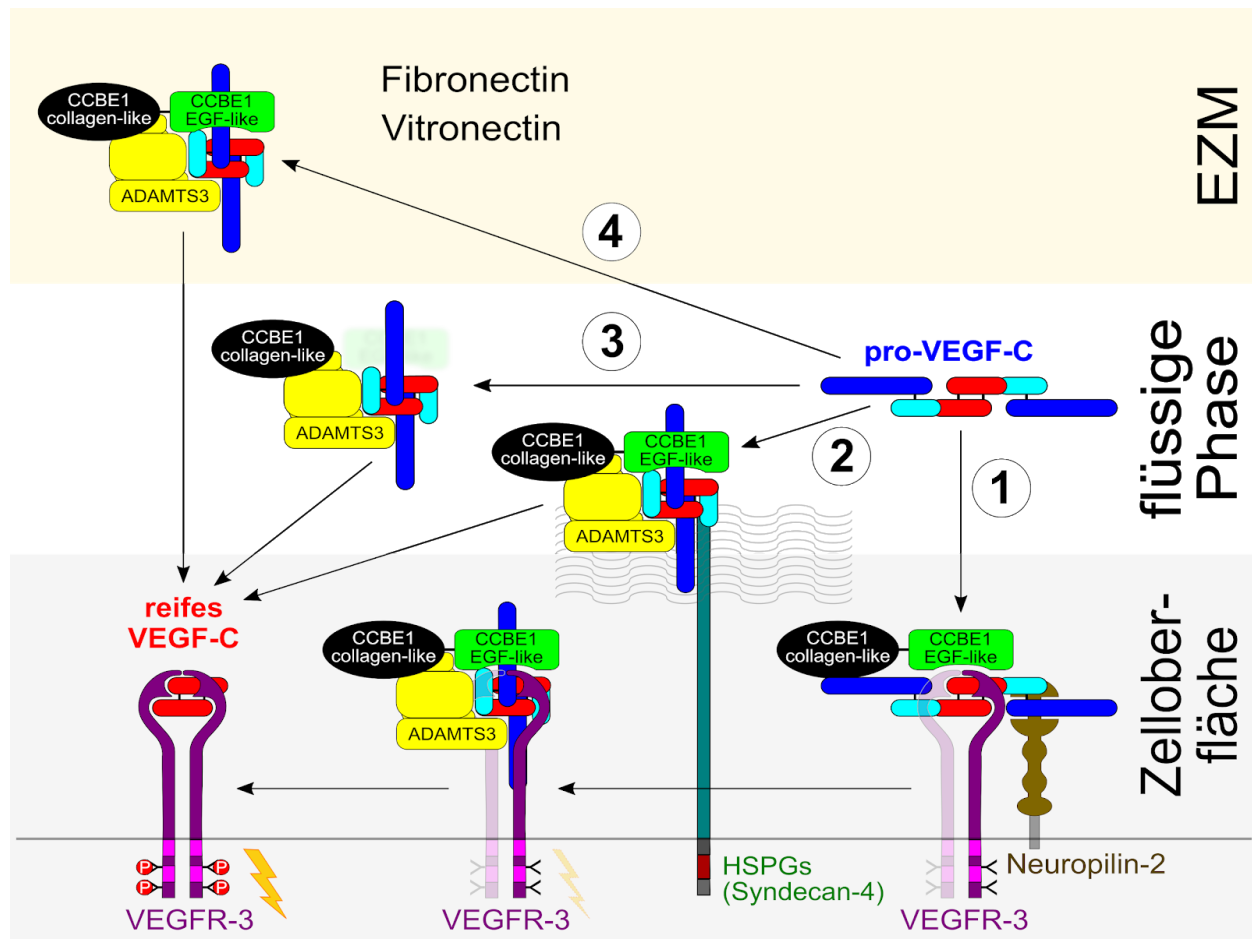


Abbildung 8. Die verschiedenen Aktivierungswege von VEGF-C. Die proteolytische Spaltung von pro-VEGF-C durch ADAMTS3 dient der Aktivierung und Mobilisierung von VEGF-C. Die Aktivierung von

295 VEGF-C kann in vier verschiedenen Umgebungen erfolgen:

1. Aktivierung von VEGFR-3-gebundenem pro-VEGF-C [26]
2. Aktivierung von HSPG-gebundenem VEGF-C [9]
3. Aktivierung von VEGF-C in der löslichen Phase [35]
4. Aktivierung von EZM-gebundenem VEGF-C [40].

300 VEGFR-3-gebundenes, aber inaktives VEGF-C kann nach proteolytischer Aktivierung sofort mit der Signalübertragung beginnen (Aktivierungsmodus 1), während HSPG-gebundenes VEGF-C zuerst vom HSPG dissoziieren und den VEGFR-3 finden muss (Aktivierungsmodus 2). Die Aktivierung von VEGF-C kann auch in der löslichen Phase stattfinden (Aktivierungsmodus 3). Immunohistochemisch findet man jedoch den überwiegenden Anteil von pro-VEGF-C, CCBE1 und ADAMTS3 gebunden an die extrazelluläre Matrix (EZM, Aktivierungsmodus 4) oder auf Zelloberflächen (Aktivierungsmodi 1 und 2). CCBE1 hat für die Aktivierung zwei Aufgaben: Die C-terminale Domäne beschleunigt die proteolytische Spaltung, während die N-terminale Domäne pro-VEGF-C zur effizienten Bildung des trimeren Aktivierungskomplexes rekrutiert. Abbildung 8 modifiziert unter Creative Commons nach [40].

310

<i>Protease</i>	<i>Schnittstelle</i>	<i>Anmerkungen</i>	<i>diese Form aktiviert:</i>	<i>Referenz</i>
Plasmin (primäre Schnittstelle)	Arg102↓ Thr103	Nebenform, vermutlich verantwortlich für die Aktivierung von VEGF-C in der Wundheilung	VEGFR-2 VEGFR-3	[26,41]
ADAMTS3	Ala111↓ Ala112	Hauptform, für die Lymphangiogenese während der Embryonalentwicklung, CCBE1-reguliert	VEGFR-2 VEGFR-3	[26,32,33,40]
KLK3/PSA	Tyr114↓ Asn115	aktiviert VEGF-C in der Samenflüssigkeit, CCBE1-reguliert	VEGFR-2 VEGFR-3	[42]
Cathepsin D	Leu119↓ Lys120	in Samenflüssigkeit und Speichel enthalten	hauptsächlich VEGFR-3	[42]
Plasmin (sekundäre Schnittstelle)	Arg127↓ Lys128	inaktive Form		[26]

Tabelle 1. Vier Proteinasen sind in der Literatur als VEGF-C-Aktivatoren bekannt. Eine Sonderstellung nimmt Plasmin ein, weil es bei längerer Einwirkung VEGF-C inaktiviert, indem es an einer sekundären Schnittstelle schneidet.

Aktivierung von VEGF-C in Tumoren

Obwohl VEGF-C und dessen Aktivierung unabdingbar für die Entwicklung des Lymphgefäßsystems sind [33,52] und im erwachsenen Organismus zumindest einige lymphatische Gefäße permanent VEGF-C für ihre Aufrechterhaltung benötigen [19], muss die Menge des aktiven VEGF-C genau reguliert werden. Eine Deregulierung mit katastrophalen Folgen findet bei Tumorerkrankungen statt.

Der Zusammenhang zwischen dem von VEGF-A vermittelten Blutgefäß- und Tumorwachstum ist gut untersucht und wird auch in der anti-angiogenen Tumorthherapie durch den Wirkstoff Bevacizumab (Avastin) gezielt blockiert [53]. Wahrscheinlich wird die Mehrzahl aller Tumore klinisch nie relevant, weil sie nicht die Fähigkeit erwerben, das Wachstum von Blutgefäßen anzuregen [54]. Ohne die Umschaltung auf VEGF-A-Produktion und die damit einsetzende Vaskularisierung ("angiogenic switch") können diese Tumore nie größer als wenige Millimeter wachsen, weil ihnen Sauerstoff und Nährstoffe fehlen [55,56].

Allerdings können Tumore nicht nur VEGF-A, sondern auch VEGF-C produzieren. Der Einfluss von VEGF-C auf das Tumorwachstum erfolgt auf mehreren Ebenen:

1. VEGF-C kann VEGFR-2 aktivieren und dadurch VEGF-A als Blutgefäß-Wachstumsfaktor ersetzen [57].
2. VEGF-C kann VEGFR-3 stimulieren, welches sich insbesondere auf neu sprossenden Blutgefäßen des Tumors findet [58].
3. Tumorzellen können auch selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren und durch VEGF-C autokrin oder parakrin zum Wachstum angeregt werden [59].
4. VEGF-C kann das Lymphgefäßwachstum anregen und dadurch die Metastasierung vorantreiben [60–62].

Anders als für die Blockade von VEGF-A gibt es für die Blockade von VEGF-C noch keine zugelassene medikamentöse Therapie. Dies lässt sich vielleicht damit erklären, dass durch die unterschiedliche proteolytische Aktivierung viele verschiedene Formen von VEGF-C entstehen. Eine wirksame Blockierung müsste vermutlich alle Formen von VEGF-C und darüber hinaus vermutlich auch alle Formen von VEGF-D blockieren, da VEGF-D ähnliche Signale für das Tumorwachstum liefern kann wie VEGF-C [63].

Welche Proteinasen VEGF-C bei Tumorerkrankungen aktivieren, ist experimentell noch nicht erforscht, aber Cathepsin D und PSA dürften zumindest für bestimmte Tumortypen eine Rolle spielen. Die Expression von Cathepsin D wurde schon vor langer Zeit mit der Tumor-Metastasierung korreliert [64]. Obwohl im Gegensatz zu Cathepsin D der Zusammenhang zwischen PSA und Tumorentwicklung viel intensiver studiert wurde, kommen verschiedene Studien zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen bezüglich einer den Tumor begünstigenden Funktion von PSA [65–69]. Einige Autoren postulieren, dass PSA das frühe Tumorwachstum begünstigt, aber in späteren Stadien dessen Entwicklung hemmt [70]. In jedem Fall sind mit der Aktivierung von VEGF-C durch Cathepsin D und PSA mögliche mechanistische Bindeglieder identifiziert worden, welche die experimentelle Beantwortung dieser und ähnlicher Fragen ermöglichen.

Pro-VEGF-C oder aktives VEGF-C?

Die überwiegende Mehrheit der Studien über die Rolle von VEGF-C für das Tumorwachstum beschreiben die Korrelation von VEGF-C-Messwerten mit dem Krankheitsverlauf. Keine einzige dieser Studien

unterscheidet allerdings zwischen aktivem und pro-VEGF-C. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass erst seit 2014 bekannt ist, dass pro-VEGF-C inaktiv ist, und dass es noch keinen Test gibt, der die beiden Formen voneinander unterscheiden kann. Für RNA-basierte Expressionsanalysen (z.B. Gene-Chip®, RNA-Seq) ist dies auch strenggenommen nicht möglich, da alle VEGF-C-Formen von demselben RNA-Transkript des *VEGFC*-Gens produziert werden. Eine Unterscheidung der unterschiedlichen VEGF-C Formen wäre mit einem Antikörper-basierten Test (ELISA, Western-Blot) möglich, aber z.Z. existiert ein solcher Test noch nicht. Die Mehrheit der kommerziell verfügbaren Antikörper gegen VEGF-C ist nicht einmal in der Lage, VEGF-C überhaupt mit der notwendigen Empfindlichkeit zu erkennen [42]. Daher ist es nicht überraschend, dass die Datenlage unübersichtlich ist.

Mittlerweile geht die Zahl der klinischen Studien, die die VEGF-C-Expression von Tumoren mit dem Krankheitsverlauf korrelieren in die Hunderte ([Pubmed-Anfrage](#)). Einige Studien finden einen Zusammenhang zwischen gemessenen VEGF-C-Werten und dem Krankheitsverlauf [71,72], währenddessen ein solcher Zusammenhang aus anderen Studien nicht ersichtlich wird [73]. Kontrollierte Tierversuche bestätigen allerdings zumeist die wichtige Rolle von VEGF-C für die Metastasierung von Tumoren [60,74,75] und auch molekularbiologische Mechanismen wurden für den Zusammenhang identifiziert [76].

Aktivierung von VEGF-C für prolymphangiogene Therapien

Obwohl Lymphödeme behandelbar sind, bleibt das Ziel der Forschung eine ursächlich wirkende Therapie, weil mit Lymphdrainage und Bandagierung nur die Symptome eines insuffizienten Lymphsystems unter Kontrolle gehalten werden. Mit Bestatin (Ubenimex) und Lymfactin® wurde in den letzten Jahren mit ersten Versuchen für medikamentöse Lymphödem-Therapien begonnen. Die Studien zu Bestatin der US-Firma Eiger BioPharmaceuticals wurden allerdings schon im Herbst 2018 nach der 2. Phase abgebrochen, weil weder primäre noch sekundäre Ziele erreicht wurden [77]. Im Gegensatz dazu sind die Phase 2-Studien des finnischen Pharma-Startups Herantis zu Lymfactin® gerade ausgeweitet worden [78]. Beide Medikamente beruhen auf unterschiedlichen Wirkmechanismen. Aufgrund der Beobachtung, dass das Schmerzmittel Ketoprofen Lymphödemsymptome im Mausmodell lindert [79], wurde das Ketoprofen-ähnliche, aber spezifischere Bestatin für klinische Studien ausgewählt [80]. Ketoprofen und Bestatin gehören zur Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika und Details über deren Einfluss auf das Lymphgefäßsystems sind weitgehend unbekannt. Demgegenüber ist Lymfactin® ein gentechnologisches Biopharmazeutikum, das auf der körpereigenen VEGF-C-Produktion nach Verabreichung eines rekombinanten adenoviralen Vektors (Ad-VEGF-C) beruht (siehe Abbildung 9) und dessen Wirkmechanismus gut erforscht ist [81–83]. Je nach Anwendungsgebiet könnte die Verfügbarkeit von körpereigenen Proteinasen und CCBE1 für die Aktivierung von VEGF-C für Lymfactin®/Ad-VEGF-C ein limitierender Faktor sein. Im Tierversuch reagierte z.B. Muskelgewebe auf die Gentherapie mit VEGF-C nur mit moderater Lymphangiogenese; und erst als VEGF-C mit CCBE1 kombiniert wurde, kam es zu einem starken Wachstum der Lymphgefäße [26].

Weil das Lymphsystem nicht nur für die Drainage wichtig ist, sondern auch für die Immunfunktion, ist es nicht überraschend, dass VEGF-C als pharmakologisches Zielobjekt für eine ganze Reihe von Krankheiten des Immunsystems identifiziert wurde. Zu diesen zählen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [84], Psoriasis [85] und rheumatoide Arthritis [17], aber auch neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose und die Alzheimer-Krankheit [86]. Kontrovers und interessant ist auch der Report über die

erfolgreiche VEGF-C-Therapie beim experimentellen Herzinfarkt im Tiermodell [87].

395 Anzumerken ist, dass bei diesen pro-lymphangiogenen Anwendungen ein der Tumorthherapie konträr gegenüberstehendes Ziel verfolgt wird. Beim Lymphödem und den Immunerkrankungen soll VEGF-C meist verstärkt aktiviert werden, währenddessen in der Tumorthherapie VEGF-C blockiert werden soll. Insbesondere bei Ödemen, die als Folge operativer Krebsbehandlung auftreten, scheint dies ein gewagter Balanceakt zu sein.

400

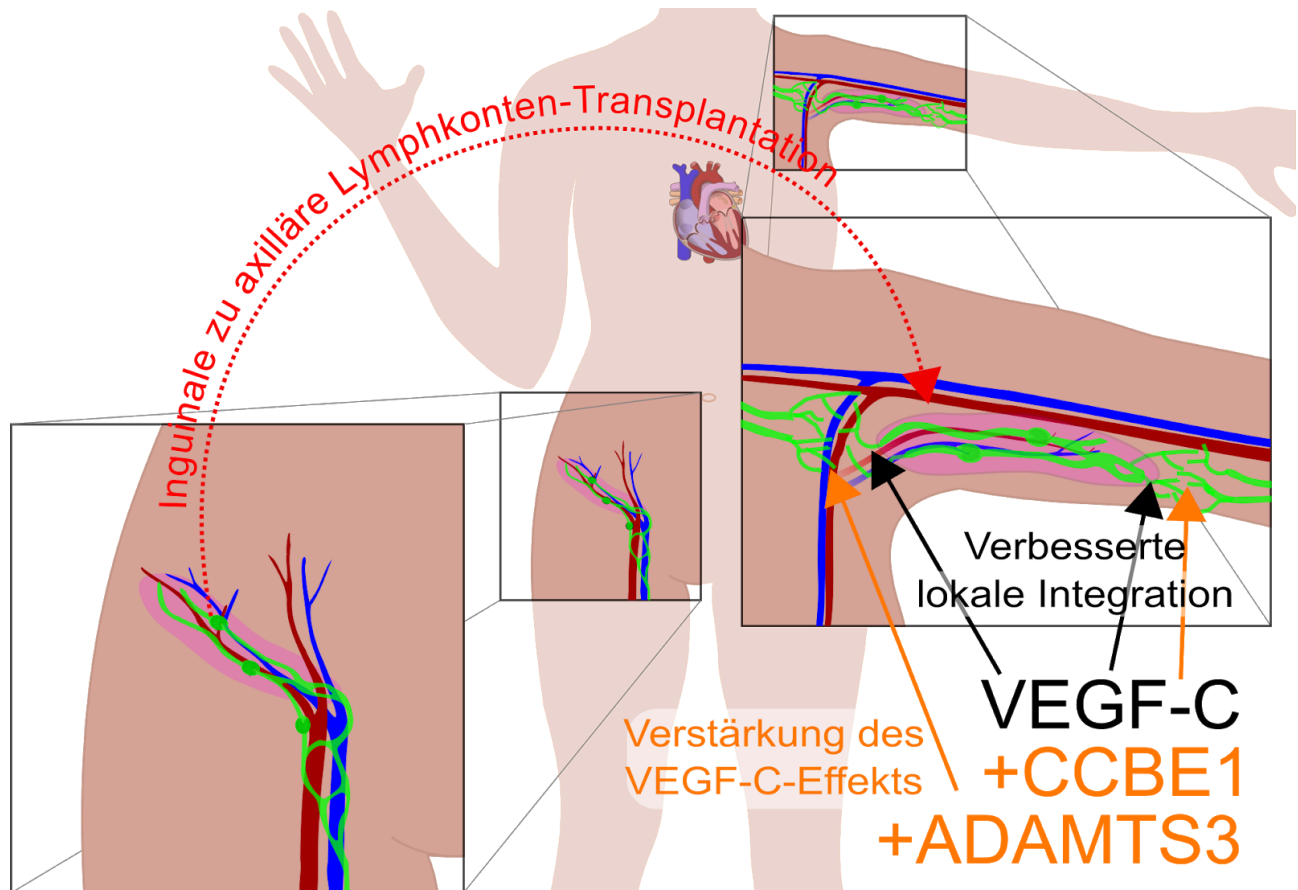


Abbildung 9. Gentherapie mit AdVEGF-C. Eine in den letzten Jahren vermehrt angewandte Therapie für Brustkrebs-assoziiertes Lymphödem ist die autologe Lymphknotentransplantation [88,89]. In vorklinischen Studien konnten die Behandlungserfolge (Integration des transplantierten Lymphknotens in das lokale Lymphgefäßnetzwerk) durch die gleichzeitige Administration von VEGF-C verbessert werden [90]. Mit dieser Strategie hat Lymfactin® erfolgreich die Phase I der klinischen Studien abgeschlossen und befindet sich in Phase II. Als Weiterentwicklung von Lymfactin® wird eine gleichzeitige Verabreichung von VEGF-C mit dem VEGF-C-aktivierenden ADAMTS3 und/oder CCBE1 diskutiert.

405

Literaturverzeichnis

- 410 1. Longstaff C, Kolev K: Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. J. Thromb. Haemost. JTH

2015; 13 Suppl 1: S98-105. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.12935>

2. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH: New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol. Rev.* 2013; 93(1): 327–58. <https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00016.2011>
3. Travis MA, Sheppard D: TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2014; 32(1): 51–82. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
4. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L: Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016; 17(10): 611–25. <https://www.nature.com/nrm/journal/v17/n10/full/nrm.2016.87.html>
5. Krebs R, Jeltsch M: Die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D. Teil 1. Grundlagen und Embryonalentwicklung. *Lymphol. Forsch. Prax.* 2013; 17(1): 30–7. http://jeltsch.org/sites/jeltsch.org/files/JeltschMichael_Lymphforsch2013_30.pdf
6. Ferrara N: Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21(5): 687–90. <http://www.molbiolcell.org/content/21/5/687>
7. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, et al.: The Carboxyl-terminal Domain(111165) of Vascular Endothelial Growth Factor Is Critical for Its Mitogenic Potency. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(13): 7788–95. <http://www.jbc.org/content/271/13/7788>
8. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML: Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* 2005; 169(4): 681–91. <http://jcb.rupress.org/content/169/4/681>
9. Johns SC, Yin X, Jeltsch M, Bishop JR, Schuksz M, Ghazal RE, et al.: Functional Importance of a Proteoglycan Co-Receptor in Pathologic Lymphangiogenesis. *Circ. Res.* 2016; 119(2): 210–21. <http://circres.ahajournals.org/content/early/2016/05/25/CIRCRESAHA.116.308504>
10. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, et al.: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 1997; 16(13): 3898–911. <https://www.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/16.13.3898>
11. Dignam SS, Case ST: Balbiani ring 3 in *Chironomus tentans* encodes a 185-kDa secretory protein which is synthesized throughout the fourth larval instar. *Gene* 1990; 88(2): 133–40. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/03781199090024L>
12. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9(6): 669–76. <https://www.nature.com/articles/nm0603-669>
13. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, et al.: Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(2): 247–57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544601/>
14. Krebs R, Tikkanen JM, Ropponen JO, Jeltsch M, Jokinen JJ, Yla-Herttuala S, et al.: Critical Role of VEGF-C/VEGFR-3 Signaling in Innate and Adaptive Immune Responses in Experimental Obliterative Bronchiolitis. *Am. J. Pathol.* 2012; 181(5): 1607–20. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944012005895>
15. Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K: Proinflammatory Cytokines Regulate Expression of the Lymphatic Endothelial Mitogen Vascular Endothelial Growth Factor-C. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(14): 8413–8. <http://www.jbc.org/content/273/14/8413>
16. Huggenberger R, Siddiqui SS, Brander D, Ullmann S, Zimmermann K, Antsiferova M, et al.: An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood* 2011; 117(17): 4667–78. <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-10-316356>
17. Zhou Q, Guo R, Wood R, Boyce BF, Liang Q, Wang Y-J, et al.: VEGF-C attenuates joint damage in chronic inflammatory arthritis by accelerating local lymphatic drainage. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(8): 2318–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3149728/>
18. Christiansen AJ, Dieterich LC, Ohs I, Bachmann SB, Bianchi R, Proulx ST, et al.: Lymphatic endothelial

cells attenuate inflammation via suppression of dendritic cell maturation. *Oncotarget* 2016; 7(26): 39421–35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5129942/>

19. Nurmi H, Saharinen P, Zarkada G, Zheng W, Robciuc MR, Alitalo K: VEGF-C is required for intestinal lymphatic vessel maintenance and lipid absorption. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7(11): 1418–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644375/>
20. Suh SH, Choe K, Hong SP, Jeong S, Mäkinen T, Kim KS, et al.: Gut microbiota regulates lacteal integrity by inducing VEGF-C in intestinal villus macrophages. *EMBO Rep.* 2019; 20(4). <https://www.embopress.org/doi/abs/10.15252/embr.201846927>
21. Planas-Paz L, Strilić B, Goedecke A, Breier G, Fässler R, Lammert E: Mechanoinduction of lymph vessel expansion. *EMBO J.* 2012; 31(4): 788–804. <https://www.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.456>
22. Urner S, Planas-Paz L, Hilger LS, Henning C, Branopolski A, Kelly-Goss M, et al.: Identification of ILK as a critical regulator of VEGFR3 signalling and lymphatic vascular growth. *EMBO J.* 2019; 38(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6331728/>
23. Basak A, Khatib A-M, Mohottalage D, Basak S, Kolajova M, Bag SS, et al.: A Novel Enediynyl Peptide Inhibitor of Furin That Blocks Processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS ONE* 2009; 4(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778948/>
24. Khatib A-M, Lahlil R, Scamuffa N, Akimenko M-A, Ernest S, Lomri A, et al.: Zebrafish ProVEGF-C Expression, Proteolytic Processing and Inhibitory Effect of Unprocessed ProVEGF-C during Fin Regeneration. *PLoS ONE* 2010; 5(7). <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011438>
25. Alders M, Hogan BM, Gjini E, Salehi F, Al-Gazali L, Hennekam EA, et al.: Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat. Genet.* 2009; 41(12): 1272–4. <http://www.nature.com/ng/journal/v41/n12/full/ng.484.html>
26. Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D, Anisimov A, Leppänen V-M, Holopainen T, et al.: CCBE1 Enhances Lymphangiogenesis via A Disintegrin and Metalloprotease With Thrombospondin Motifs-3-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor-C Activation. *Circulation* 2014; 129(19): 1962–71. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002779>
27. Le Guen L, Karpanen T, Schulte D, Harris NC, Koltowska K, Roukens G, et al.: Ccbe1 regulates Vegfc-mediated induction of Vegfr3 signaling during embryonic lymphangiogenesis. *Development* 2014; 141(6): 1239–49. <http://dev.biologists.org/content/141/6/1239>
28. Apte SS: A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(46): 31493–7. <http://www.jbc.org/content/284/46/31493>
29. Colige A, Vandenbergh I, Thiry M, Lambert CA, Beeumen JV, Li S-W, et al.: Cloning and Characterization of ADAMTS-14, a Novel ADAMTS Displaying High Homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(8): 5756–66. <http://www.jbc.org/content/277/8/5756>
30. Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR, et al.: Procollagen II Amino Propeptide Processing by ADAMTS-3 INSIGHTS ON DERMATOSPARAXIS. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(34): 31502–9. <http://www.jbc.org/content/276/34/31502>
31. Van Damme T, Colige A, Syx D, Giunta C, Lindert U, Rohrbach M, et al.: Expanding the clinical and mutational spectrum of the Ehlers–Danlos syndrome, dermatosparaxis type. *Genet. Med.* 2016; 18(9): 882–91. <https://www.nature.com/articles/gim2015188>
32. Brouillard P, Dupont L, Helaers R, Coulie R, Tiller GE, Peeden J, et al.: Loss of ADAMTS3 activity causes Hennekam lymphangiectasia–lymphedema syndrome 3. *Hum. Mol. Genet.* 2017; 26(21): 4095–104. <https://academic.oup.com/hmg/article/26/21/4095/4060581>
33. Janssen L, Dupont L, Bekhouche M, Noel A, Leduc C, Voz M, et al.: ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis* 2015; : 1–13.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10456-015-9488-z>

34. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, et al.: Biosynthesis of Vascular Endothelial Growth Factor-D Involves Proteolytic Processing Which Generates Non-covalent Homodimers. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(45): 32127–36. <http://www.jbc.org/content/274/45/32127>
35. Bui HM, Enis D, Robciuc MR, Nurmi HJ, Cohen J, Chen M, et al.: Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(6): 2167–80. <https://www.jci.org/articles/view/83967>
36. Saaristo A: Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds. *FASEB J.* 2004; 18(14): 1707–9. <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.04-1592fje>
37. Saaristo A, Tammela T, Farkkilä A, Kärkkäinen M, Suominen E, Ylä-Herttuala S, et al.: Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am. J. Pathol.* 2006; 169(3): 1080–7.
38. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, et al.: Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb. Haemost.* 1998; 80(1): 171–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684805>
39. Schäfer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD: Plasminogen activation in healing human wounds. *Am. J. Pathol.* 1994; 144(6): 1269–80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1887462/>
40. Jha SK, Rauniyar K, Karpanen T, Leppänen V-M, Brouillard P, Vikkula M, et al.: Efficient activation of the lymphangiogenic growth factor VEGF-C requires the C-terminal domain of VEGF-C and the N-terminal domain of CCBE1. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 4916. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04982-1>
41. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, et al.: Plasmin Activates the Lymphangiogenic Growth Factors VEGF-C and VEGF-D. *J. Exp. Med.* 2003; 198(6): 863–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2194198/>
42. Jha SK, Rauniyar K, Chronowska E, Mattonet K, Maina EW, Koistinen H, et al.: KLK3/PSA and cathepsin D activate VEGF-C and VEGF-D. *eLife* 2019; 8: e44478. <https://elifesciences.org/articles/44478>
43. Brand HS, Ligtenberg AJM, Veerman ECI: Saliva and Wound Healing. *Saliva Secret. Funct.* 2014; 24: 52–60. <https://www.karger.com/Article/FullText/358784>
44. Singh N, Tiem M, Watkins R, Cho YK, Wang Y, Olsen T, et al.: Soluble vascular endothelial growth factor receptor 3 is essential for corneal alymphaticity. *Blood* 2013; 121(20): 4242–9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3656456/>
45. Matsumura M, Bhatt AS, Andress D, Clegg N, Takayama TK, Craik CS, et al.: Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *The Prostate* 2005; 62(1): 1–13. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.20101/abstract>
46. de Lamirande E: Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007; 33(1): 60–8. <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-958463>
47. Brown LF*, Yeo K-T, Berse B, Morgentaler A, Dvorak HF, Rosen S: Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) is Strongly Expressed in the Normal Male Genital Tract and is Present in Substantial Quantities in Semen. *J. Urol.* 1995; 154(2): 576–9. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534701671143>
48. Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, et al.: Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil. Steril.* 1999; 72(2): 269–75. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028299002344>
49. Iyibozkurt AC, Balcik P, Bulgurcuoglu S, Arslan BK, Attar R, Attar E: Effect of vascular endothelial

- 555 growth factor on sperm motility and survival. *Reprod. Biomed. Online* 2009; 19(6): 784–8.
<http://www.rbmojournal.com/article/S1472648309000832/abstract>
50. Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S: VEGF C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2009; 182(7): 4085–92.
 560 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616376/>
51. Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J: Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004; 41(3): 233–64.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408360490460933>
52. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 2004; 5(1): 74–80. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1013>
- 565 53. Weis SM, Cheresh DA: Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* 2011; 17(11): 1359–70. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2537>
54. Folkman J, Kalluri R: Cancer without disease. *Nature* 2004; 427(6977): 787.
 570 <https://www.nature.com/articles/427787a>
55. Baeriswyl V, Christofori G: The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009; 19(5): 329–37. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X09000649>
56. Hanahan D, Folkman J: Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3): 353–64.
 575 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400801087>
57. Carpenter RL, Paw I, Zhu H, Sirkisoon S, Xing F, Watabe K, et al.: The gain-of-function GLI1 transcription factor TGLI1 enhances expression of VEGF-C and TEM7 to promote glioblastoma angiogenesis. *Oncotarget* 2015; 6(26): 22653–65.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4673189/>
- 580 58. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al.: Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008; 454(7204): 656–60. <https://www.nature.com/articles/nature07083>
59. Michaelsen SR, Staberg M, Pedersen H, Jensen KE, Majewski W, Broholm H, et al.: VEGF-C sustains VEGFR2 activation under bevacizumab therapy and promotes glioblastoma maintenance.
 585 *Neuro-Oncol.* 2018; 20(11): 1462–74.
<https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/20/11/1462/5043488>
60. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttua S, Jäättelä M, et al.: Vascular Endothelial Growth Factor C Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Intralymphatic Tumor Growth. *Cancer Res.* 2001; 61(5): 1786–90. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/5/1786>
- 590 61. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al.: Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 2001; 20(4): 672–82. <https://www.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/20.4.672>
62. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al.: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 2001; 7(2): 192–8.
 595 https://www.nature.com/articles/nm0201_192
63. Harris NC, Paavonen K, Davydova N, Roufai S, Sato T, Zhang Y-F, et al.: Proteolytic processing of vascular endothelial growth factor-D is essential for its capacity to promote the growth and spread of cancer. *FASEB J.* 2011; 25(8): 2615–25. <https://www.fasebj.org/doi/full/10.1096/fj.10-179788>
64. Spyrtatos F, Hacene K, Rouëssé J, Brunet M, Andrieu C, Desplaces A, et al.: Cathepsin D: An Independent Prognostic Factor for Metastasis of Breast Cancer. *The Lancet* 1989; 334(8672): 1115–8. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673689914876>
- 600 65. Fortier AH, Nelson BJ, Grella DK, Holaday JW: Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J.*

Natl. Cancer Inst. 1999; 91(19): 1635–1640.

<http://jnci.oxfordjournals.org/content/91/19/1635.short>

66. Ishii K, Otsuka T, Iguchi K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, et al.: Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Lett.* 2004; 207(1): 79–87.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383503006736>
67. LeBeau AM, Kostova M, Craik CS, Denmeade SR: Prostate-specific antigen: an overlooked candidate for the targeted treatment and selective imaging of prostate cancer. *Biol. Chem.* 2010; 391(4): 333–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454521/>
68. Mattsson JM, Laakkonen P, Stenman U, Koistinen H: Antiangiogenic properties of prostate-specific antigen (PSA). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2009; 69(4): 447–51.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365510903056031>
69. Webber MM, Waghay A, Bello D: Prostate-specific antigen, a serine protease, facilitates human prostate cancer cell invasion. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1(10): 1089–94.
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/1/10/1089>
70. Koistinen HK, Stenman U-H: PSA (Prostate-Specific Antigen) and other Kallikrein-related Peptidases in Prostate Cancer. In: Magdolen V, Sommerhoff C, Fritz H, Schmitt M, editors. *Kallikrein-related Peptidases . Novel Cancer related Biomarkers.* deGruyter; 2012. page 61–81.
<https://researchportal.helsinki.fi/en/publications/psa-prostate-spacific-antigen-and-other-kallikrein-related-peptid>
71. Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber J-E: Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *The Prostate* 2005; 65(2): 110–6.
<https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.20276>
72. Yang Z-S, Xu Y-F, Huang F-F, Ding G-F: Associations of nm23H1, VEGF-C, and VEGF-3 Receptor in Human Prostate Cancer. *Molecules* 2014; 19(5): 6851–62.
<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/6851>
73. Mori R, Dorff TB, Xiong S, Tarabolous CJ, Ye W, Groshen S, et al.: The relationship between proangiogenic gene expression levels in prostate cancer and their prognostic value for clinical outcomes. *The Prostate* 2010; 70(15): 1692–700.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.21204>
74. Brakenhielm E, Burton JB, Johnson M, Chavarria N, Morizono K, Chen I, et al.: Modulating metastasis by a lymphangiogenic switch in prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2018; 121(10): 2153–61.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.22900>
75. Burton JB, Priceman SJ, Sung JL, Brakenhielm E, An DS, Pytowski B, et al.: Suppression of Prostate Cancer Nodal and Systemic Metastasis by Blockade of the Lymphangiogenic Axis. *Cancer Res.* 2008; 68(19): 7828–37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2800077/>
76. Rinaldo F, Li J, Wang E, Muders M, Datta K: RalA regulates vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) synthesis in prostate cancer cells during androgen ablation. *Oncogene* 2007; 26(12): 1731–8. <https://www.nature.com/articles/1209971>
77. Eiger BioPharmaceuticals: Eiger BioPharmaceuticals Announces Phase 2 ULTRA Results of Ubenimex in Lower Leg Lymphedema: Study Did Not Meet Primary or Secondary Endpoint. EigerBio2018;
<http://www.eigerbio.com/eiger-biopharmaceuticals-announces-phase-2-ultra-results-of-ubenimex-in-lower-leg-lymphedema-study-did-not-meet-primary-or-secondary-endpoint/>
78. Herantis Pharma Plc: Herantis Pharma Announces Expansion of its Phase 2 Study AdeLE in Breast Cancer Associated Lymphedema with Two Centers in Sweden. Herantis Pharma2019;
<http://herantis.com/release/herantis-pharma-announces-expansion-of-its-phase-2-study-adele-in->

breast-cancer-associated-lymphedema-with-two-centers-in-sweden/

79. Jin DP, An A, Liu J, Nakamura K, Rockson SG: Therapeutic Responses to Exogenous VEGF-C Administration in Experimental Lymphedema: Immunohistochemical and Molecular Characterization. *Lymphat. Res. Biol.* 2009; 7(1): 47–57.
655 <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/lrb.2009.0002>
80. Tian W, Rockson SG, Jiang X, Kim J, Begaye A, Shuffle EM, et al.: Leukotriene B₄ antagonism ameliorates experimental lymphedema. *Science Translational Medicine* 2017; 9(389): eaal3920.
<http://stm.sciencemag.org/content/9/389/eaal3920>
81. Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo H, Stenback F, Prevo R, et al.: Adenoviral Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-C Induces Lymphangiogenesis in the Skin. *Circ. Res.* 2001; 88(6): 623–9. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/res.88.6.623>
660
82. Honkonen KM, Visuri MT, Tervala TV, Halonen PJ, Koivisto M, Lahtenvuo MT, et al.: Lymph Node Transfer and Perinodal Lymphatic Growth Factor Treatment for Lymphedema. *Ann. Surg.* May 2013 2013; 257(5): 961–7. <https://insights.ovid.com/article/00000658-201305000-00026>
83. Visuri MT, Honkonen KM, Hartiala P, Tervala TV, Halonen PJ, Junkkari H, et al.: VEGF-C and VEGF-C156S in the pro-lymphangiogenic growth factor therapy of lymphedema: a large animal study. *Angiogenesis* 2015; 18(3): 313–26.
665 <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10456-015-9469-2>
84. Wang X, Zhao J, Qin L: VEGF-C mediated enhancement of lymphatic drainage reduces intestinal inflammation by regulating IL-9/IL-17 balance and improving gut microbiota in experimental chronic colitis. *Am. J. Transl. Res.* 2017; 9(11): 4772–84.
670 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5714765/>
85. Liew S-C, Das-Gupta E, Chakravarthi S, Wong S-F, Lee N, Safdar N, et al.: Differential expression of the angiogenesis growth factors in psoriasis vulgaris. *BMC Res. Notes* 2012; 5: 201.
675 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3392727/>
86. Dissing-Olesen L, Hong S, Stevens B: New Brain Lymphatic Vessels Drain Old Concepts. *EBioMedicine* 2015; 2(8): 776–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563157/>
87. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, et al.: Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature* 2015; 522(7554): 62–7.
680 <http://www.nature.com/nature/journal/v522/n7554/full/nature14483.html>
88. Becker C: Treatment of Breast Cancer-Related Lymphedema Using Combined Autologous Breast Reconstruction and Autologous Lymph Node Transplantation. *Breast Reconstr. - Curr. Perspect. State Art Tech.* 2013;
685 <https://www.intechopen.com/books/breast-reconstruction-current-perspectives-and-state-of-the-art-techniques/treatment-of-breast-cancer-related-lymphedema-using-combined-autologous-breast-reconstruction-and-au>
89. Früh FS, Harder Y: Die vaskularisierte Lymphknoten- Transplantation. *Cardiovasc* 2017; 16(5): 16–20. <https://www.medizinonline.ch/artikel/die-vaskularisierte-lymphknoten-transplantation>
90. Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikä J, Kotronen A, Pitkonen M, et al.: Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat. Med.* 2007; 13(12): 1458–66.
690 <http://www.nature.com/nm/journal/v13/n12/full/nm1689.html>